

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 560 046**

②1 N° d'enregistrement national :

**85 02617**

⑤1 Int Cl<sup>4</sup> : A 61 K 35/74; A 23 C 9/12, 11/00; C 12 N  
1/20 // (C 12 N 1/20, C 12 R 1:01).

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 22 février 1985.

③0 Priorité : DE, 24 février 1984, n° P 34 06 772.8.

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 35 du 30 août 1985.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *SCHULER Rudolf et SCHULER Angelo.*  
— DE.

⑦2 Inventeur(s) : Rudolf Schuler et Angelo Schuler.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Plasseraud.

⑤4 Produit diététique utile pour diminuer la concentration de l'urée dans les liquides physiologiques et procédé pour sa  
préparation.

⑤7 Produit diététique utile pour diminuer la teneur en urée  
des liquides physiologiques et sa préparation.

Le produit contient des bactéries *Bifidus* du genre *Bifido-*  
*bacterium* suis ou infantis, contenant elles-mêmes de l'uréase.  
On le prépare en cultivant les bactéries dans un milieu nutritif  
approprié, de préférence à base de lait ou de lait de soja avec  
addition de peptone et/ou d'extrait de levure, et en lyophili-  
sant la culture obtenue.

FR 2 560 046 - A1

Produit diététique utile pour diminuer la concentration de l'urée dans les liquides physiologiques et procédé pour sa préparation.

La présente invention concerne un produit diététique utile pour diminuer la concentration en urée des liquides physiologiques et un procédé pour sa préparation.

Dans les cas de maladies rénales, de transplantations rénales et dans des cas analogues, le problème se pose d'éliminer l'urée de l'organisme. Normalement, 70% de l'urée formée dans le foie par dégradation des protéines sont excrétés par les reins, et une proportion pouvant aller jusqu'à 30% est également éliminée au travers de la paroi intestinale et détruite par des bactéries ; selon le pH régnant dans l'intestin, il y a fixation dans l'intestin et excrétion (aux pH acides) ou bien, en pH alcalin, il y a résorption et transport en retour de l'ammoniac toxique vers le foie. Dans les cas de maladies rénales, il fallait jusqu'à maintenant, pour éliminer l'excès d'urée non évacué par l'intestin, procéder à intervalles réguliers à une dialyse. Si l'on pouvait parvenir à éliminer une plus grande partie de l'urée par l'intermédiaire de l'intestin, on pourrait éventuellement diminuer la fréquence des dialyses ou même les supprimer totalement.

Une condition préalable à cet égard serait que l'urée soit éliminée en continu de l'équilibre qui doit s'établir par l'intermédiaire de la paroi intestinale. Cette condition pourrait être remplie si on produisait dans l'intestin une flore microbienne possédant une forte activité de dégradation de l'urée.

Setelae et collaborateurs de l'Université d'Helsinki ont déjà suggéré que les composés azotés résiduels des liquides physiologiques ne constituaient pas seulement des produits finals du métabolisme, devant être éliminés,

mais, pour une partie d'entre eux, étaient utiles pour une nouvelle synthèse de protéines ou d'acides aminés, de sorte qu'ils ne devaient pas être éliminés complètement ; seul l'excès devrait être éliminé. Pour parvenir à ce but, ils ont déjà proposé de modifier les conditions régnant dans l'intestin de manière à y accroître la dégradation biologique de l'azote résiduel et à provoquer ainsi un déplacement de l'équilibre biologique dans l'intestin. Simultanément, le patient devrait être maintenu à un régime approprié. Dans ces conditions, pour modifier dans le sens voulu les conditions régnant dans l'intestin, on a utilisé des microorganismes du sol, des espèces *Serratia*, *Pseudomonas* et *Rhizobium* ou *Agrobacterium*, sans autre précision, qui contiennent par adaptation des enzymes dégradant l'azote résiduel telles que des uréases, des créatinases et des enzymes analogues, et peuvent donc provoquer une dégradation accrue de l'azote résiduel, par exemple de l'urée, dans l'intestin (Kidney International, volume 13, Suppl. 8 (1978), pages 194-202). Toutefois, on a constaté que ces microorganismes n'avaient plus les propriétés voulues dans l'intestin (Proceeding Eur. Soc for Artificial Organs (ESAO) volume V, Zürich, 6-8.11.1978). En outre, pour que leurs uréases possèdent une bonne activité, ces microorganismes exigent un pH à peu près neutre. Cependant, dans ces conditions, l'ammoniac formé à la scission de l'urée est à nouveau résorbé et exerce des effets toxiques inacceptables sur le foie. C'est la raison pour laquelle les travaux de Setälä n'ont pas conduit aux résultats voulus.

L'invention vise à résoudre ce problème. Elle est basée sur la recherche d'une flore intestinale produisant une uréase ayant une forte activité en pH acide et présentant si possible son activité maximale dans ces conditions. En outre, il doit s'agir d'une uréase formée par constitution et non d'une uréase formée par adaptation en raison de la présence de l'urée.

On sait que le bas pH recherché dans l'intestin

pour l'élimination de l'ammoniac peut être provoqué par une flore de Bifidus. On a maintenant trouvé qu'il existait certaines souches de Bifidus qui, par constitution, forment une uréase à forte activité en pH acide, que cette uréase  
5 pouvait scinder en continu l'urée traversant la paroi intestinale et, par conséquent, l'éliminer de l'équilibre.

L'invention a en conséquence pour objet un produit diététique utile pour diminuer la concentration en urée des liquides physiologiques, ce produit se caractérisant en ce  
10 qu'il contient des bactéries du type Bifidus contenant elles-mêmes de l'uréase, de l'espèce Bifidobacterium suis et/ou Bifidobacterium infantis.

Les bactéries du type Bifidus à utiliser conformément à l'invention, de l'espèce Bifidobacterium suis, ont été  
15 trouvées chez les porcs. Jusqu'à maintenant, on n'en a pas trouvé chez les humains. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention, la souche Bifidobacterium suis DSM 20211. La souche préférée de l'espèce Bifidobacterium infantis est la souche DSM 2877. Celle-ci consiste en bâtonnets à gram  
20 positif, pléomorphes, anaérobies, qui forment de l'acétate et de l'acide lactique à partir du glucose. La muréine de la paroi cellulaire est du type Orn-Ser-Ala-Thr-Ala. Outre B. infantis, B. longum et B. suis contiennent également ce type de muréine. Ces trois types sont, par le génome, étroitement  
25 apparentés. La souche ne peut pas provoquer la fermentation de l'arabinose ni du mélézitose et diffère ainsi de B. infantis et B. longum/B. suis.

Le produit diététique selon l'invention peut contenir la souche de Bifidus contenant de l'uréase du genre  
30 suis ou infantis seule mais de préférence cependant il contient une combinaison avec d'autres souches de Bifidus; qui présentent principalement une capacité considérable à former de l'acidité. Parmi ces souches de Bifidus, on citera par exemple Bifidobacterium adolescentis DSM 20083, 20086,  
35 20087 et 20098 ; Bifidobacterium bifidum DSM 20082, 20215

et 20496 ; Bifidobacterium Breve DSM 20091, 20213 ;  
Bifidobacterium catenulatum DSM 20103 ; Bifidobacterium  
infantis DSM 20088, 20090 et 20223 ; Bifidobacterium longum  
DSM 20097 et 20219 ; Bifidobacterium sp DSM 20093.

5           En dehors des souches de Bifidus mentionnées, le  
produit diététique selon l'invention peut encore contenir  
des additifs usuels tels que des substances aromatisantes,  
des colorants, des diluants et des substances analogues.  
De préférence, le produit contient en outre des constituants  
10 du milieu de culture, c'est-à-dire des matières solides  
contenues dans le milieu de culture dans lequel on a produit  
les bactéries. En particulier donc, le produit diététique  
contient des constituants lactés ou des matières solides de  
lait de soja et éventuellement encore de la peptone et/ou de  
15 l'extrait de levure.

Le produit diététique selon l'invention peut être  
mis sous une forme quelconque appropriée à l'administration  
orale. De préférence, il est à l'état lyophilisé, et il est  
dispersé avant administration par addition d'un liquide  
20 potable tel que l'eau, le lait, le thé ou un liquide  
analogue jusqu'à consistance appropriée, puis bu. Toutefois,  
on peut également administrer sous d'autres formes, par  
exemple dans des capsules de gélatine.

L'invention a également pour objet un procédé  
25 préféré pour préparer le produit diététique selon l'invention.  
Selon ce mode de réalisation préféré, on cultive au moins  
une souche Bifidobacterium suis ou infantis et le cas  
échéant une autre souche de Bifidobacterium dans un milieu  
nutritif approprié et on lyophilise la culture obtenue.

30           Les milieux nutritifs qui conviennent sont toutes  
les solutions nutritives convenant du point de vue physiolo-  
gique, diététique et gustatif, de préférence des produits  
lactés, par exemple le lait de soja qui est préféré, ou  
bien le petit-lait et plus particulièrement le lait écrémé.  
35 On peut introduire dans les milieux nutritifs d'autres

additifs, par exemple l'extrait de levure et/ou des peptones et/ou d'autres substances favorisant la digestion, de préférence en quantité de 1 à 10 g/l par rapport au milieu nutritif fini. En particulier, lorsqu'on utilise du lait

5 écrémé préparé habituellement à partir de poudre de lait écrémé et d'eau, il est recommandé d'ajouter de l'extrait de levure et/ou de la peptone. On peut également utiliser un mélange de deux ou plusieurs des milieux nutritifs appropriés mentionnés ci-dessus. De préférence, on ajoute 0,4 à 0,5% en

10 poids d'extrait de levure et 0,4 à 0,6% en poids de peptone, par rapport au volume de la solution.

Comme on l'a déjà signalé, on peut ajouter au produit diététique selon l'invention d'autres additifs usuels, en particulier des additifs convenant pour les applications

15 diététiques, par exemple du glucose, du bêta-lactose et du lactulose. A l'état lyophilisé, le produit contient de préférence de  $10^6$  à  $10^{10}$ , plus particulièrement de  $10^8$  à  $10^9$  cellules bactériennes vivantes de Bifidum par gramme.

Les microorganismes sont cultivés de la manière

20 connue et habituelle.

La durée de culture dépend de la température. De préférence, on cultive pendant 15 à 30 h à une température de 15 à 45°C et plus particulièrement pendant 24 h à une température de  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ . Pendant la culture, on maintient

25 de préférence un pH de 5,7 à 5,9, de préférence au moyen d'un alcali. Le lait de chaux (solution d'hydroxyde de calcium) qu'on ajoute en général 2 à 4 fois au cours de la culture, convient tout particulièrement.

Le produit diététique selon l'invention permet de

30 diminuer la quantité d'urée des liquides physiologiques beaucoup plus fortement que par l'élimination intestinale normale. On peut alors, même dans le cas de défaillance rénale, diminuer la teneur en urée au point que les quantités résiduelles soient inoffensives ou puissent être

35 éliminées sans traitement de dialyse ou par un plus petit

nombre de traitements, de sorte qu'on peut prolonger considérablement la période séparant les dialyses individuelles. Naturellement, le malade en ressent un grand soulagement mais en outre, on évite une élimination excessive des  
5 composés azotés nécessaires pour les nouvelles synthèses dans l'organisme.

L'exemple qui suit illustre l'invention sans toutefois en limiter son cadre.

Exemple

- 10 On inocule par une culture pure de Bifidobacterium infantis DSM 2877 une solution nutritive préparée à partir de poudre de lait de soja et d'eau, à laquelle on a ajouté, par rapport à la solution nutritive finie, 0,5% en poids d'extrait de levure et 0,5% en poids de peptone. On cultive  
15 pendant 24 h à une température de 37°C. A intervalles réguliers d'environ 8 h, on règle le pH à 5,8 - 5,9 par addition de la quantité nécessaire de lait de chaux. On refroidit ensuite la culture et on lyophilise. Le lyophilisat ainsi obtenu est conservé au froid. Pour l'administration,  
20 on délaie le produit dans de l'eau tiède (environ 1 cuillère à thé pour 1/4 de litre d'eau) et on boit immédiatement la suspension obtenue.

A la place du lait de soja, on peut utiliser du lait écrémé ou du petit-lait.

## REVENDICATIONS

1. Produit diététique utile pour diminuer la concentration en urée des liquides physiologiques, caracté-  
risé en ce qu'il contient des bactéries Bifidus contenant  
5 une uréase, de l'espèce Bifidobacterium suis ou infantis.
2. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient Bifidobacterium suis DSM 20211 et/ou Bifidobacterium infantis DSM 2877.
3. Produit selon la revendication 1 ou 2,  
10 caractérisé en ce qu'il contient en outre d'autres espèces Bifidus.
4. Produit selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il contient en outre au moins une des souches Bifidobacterium adolescentis DSM 20083, 20086, 20087 et  
15 20098 ; Bifidobacterium bifidum DSM 20082, 20215 et 20496 ; Bifidobacterium breve DSM 20091, 20213 ; Bifidobacterium catenulatum DSM 20103 ; Bifidobacterium infantis DSM 20088, 20090 et 20223 ; Bifidobacterium longum DSM 20097 et 20219 et/ou Bifidobacterium sp DSM 20093.
- 20 5. Produit selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il contient en outre des constituants du milieu de culture des souches Bifidus contenues.
6. Produit selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il contient en tant que constituants du milieu de  
25 culture, des constituants lactés ou des matières solides de lait de soja.
7. Produit selon la revendication 5 ou 6, caracté-  
risé en ce qu'il contient de la peptone et/ou de l'extrait de levure.
- 30 8. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est à l'état lyophilisé.
9. Procédé de préparation du produit diététique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on cultive au moins une souche Bifidobacterium  
35 suis et/ou infantis et le cas échéant au moins une autre



souche Bifidobacterium dans un milieu nutritif approprié et on lyophilise la culture obtenue.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'on utilise en tant que milieu nutritif du lait ou du lait de soja additionné de peptone et/ou d'extrait de levure.
- 5

